

Über den Einbau C^{14} -markierter
Aminosäuren in das Protein zellfreier
Nukleoproteid-Enzym-Systeme
aus *Escherichia coli* B.

von

DIETRICH SCHACHTSCHABEL

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie

Direktor: Prof. Dr. Adolf Butenandt

Über den Einbau C¹⁴-markierter Aminosäuren
in das Protein zellfreier Nukleoprotein-Enzym-Systeme
aus Escherichia coli B.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Dietrich Schachtschabel
aus Jena



1959

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referenten: Prof. Dr. Dr. A. Butenandt

Prof. Dr. R. Wagner

Dekan: Prof. Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 20.3.1959

Inhaltsübersicht

Problemstellung und Einleitung	1 - 6
Allgemeiner Teil	
I Methoden	
A Gewinnung der Bakterien	7
B Homogenisieren der Bakterien	7 - 8
a) Aufbau und Arbeitsweise des Homogenisations- Vibrators	
b) Gewinnung des Bakterienhomogenates	
C Fraktionierung des Bakterienhomogenates	8 - 10
a) Gewinnung der Debris-Fraktion	
b) Gewinnung eines 1 Std-105.000 g-Überstandes und eines 1 Std-105.000 g-Sedimentes	
c) Gewinnung eines 14 Std-105.000 g-Überstandes und eines 14 Std-105.000 g-Sedimentes	
D Einbauversuche	10-11
a) Aufarbeitungsgang zur Bestimmung ins Protein eingebauter radioaktiv markierter Aminosäuren	
b) Zusammensetzung des zum Homogenisieren der Bak- terien und zur Inkubation verwendeten Puffers	
E Chemische Analysen	12
F Physikalische Methoden	12
a) Ultrazentrifuge	
b) Elektrophorese	
c) Elektronenmikroskop	
II Beschreibung und Deutung der Versuchsergebnisse	
A Charakterisierung der Fraktionen	
a) Debris-Fraktion	12-13
b) 1 Std-105.000 g-Überstand, Phenolspaltung des 1 Std-105.000 g-Überstandes	14-17
c) Nukleoproteid-Fraktion	17-18
d) 14 Std-105.000 g-Überstand, pH 4-Fraktion	18-19
B Nachweis und Eigenschaften eines Einbausystems für Leucin-1-C ¹⁴ in der Debris-Fraktion (Debris- Einbausystem)	19-24
C Nachweis und Eigenschaften eines Einbausystems für Leucin-1-C ¹⁴ im 1 Std-105.000 g-Überstand (Nukleoproteid-Einbausystem)	24-30
Diskussion	31-34
Zusammenfassung	35
Literatur-Verzeichnis	36-38

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Adolf Butenandt in der Zeit von Februar 1957 bis Juli 1958 am Max-Planck-Institut für Biochemie zu München ausgeführt.

Herrn Prof. Butenandt danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Dr. Zillig bin ich für wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Für die Anfertigung der elektronen-mikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Dr. P. Hofschneider, für technische Unterstützung Frä. Albers, Frä. Preuss und Herrn Hölzel.

Problemstellung und Einleitung

Im Rahmen von Untersuchungen über den Mechanismus der Proteinbiosynthese hatte ich die Aufgabe, aus lebenden Zellen ein zellfreies, fraktionierbares Enzymsystem zu isolieren, das das Studium der biologischen Eiweißsynthese unter definierten Bedingungen ermöglichen sollte.

Um einen möglichst weitgehenden Beitrag zur Lösung des gestellten Problems leisten zu können, sollte ein solches System eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen:

1.) Es sollte nach Möglichkeit nur aus den essentiellen Komponenten und Cofaktoren zusammengesetzt sein und in Teilsysteme, die einzelne, nacheinander ablaufende Reaktionsschritte katalysieren, zerlegt werden können.

2.) Es sollte ein definiertes System sein, nicht nur hinsichtlich der am Gesamtvorgang teilnehmenden Bestandteile, wie z.B. Enzyme und Cofaktoren, sondern auch hinsichtlich des Reaktionsproduktes. Es wäre wünschenswert, die Biosynthese eines bekannten, empfindlich nachweisbaren oder gar isolierbaren spezifischen Proteins in einem solchen System zu untersuchen.

3.) Es sollte den Angriff auf ein Kernproblem der Eiweißbiosynthese, die Frage nach der Rolle der Nukleinsäuren bei der Prägung der Proteinspezifität, ermöglichen. Deshalb sollte die Nukleinsäure, die die Information für die Synthese eines bestimmten Proteins trägt, in reiner Form zugänglich sein.

Auf Grund dieser Überlegungen wurden als Versuchsmaterial Bakterien vom Stamm *Escherichia coli* B gewählt. Für den Zweck unserer Untersuchungen sollten diese Bakterien zwei Vorteile haben: Es ist anzunehmen, daß sie wegen ihres schnellen Wachstums einen besonders leistungsfähigen Proteinsyntheseapparat besitzen; zum anderen lassen sie sich mit Phagen infizieren, die nur aus Protein und Desoxyribonukleinsäure (DNS) bestehen. Es wurde gezeigt, daß diese

DNS allein zur Übermittlung der für die Phagenvermehrung notwendigen Information ausreicht (1). Deshalb wird erhofft, mit Hilfe dieser Viren Einblicke in die Synthese spezifischer Eiweißstoffe zu erhalten, wobei besonders die Rolle der DNS untersucht werden kann.

Die Erforschung der bei der Proteinsynthese innerhalb der Zelle ablaufenden Vorgänge hat in den vergangenen Jahren große Fortschritte gemacht. Es soll deshalb zunächst ein kurzer Überblick über den gegenwärtigen Stand unseres Wissens vom Mechanismus der Proteinbiosynthese gegeben werden.

Der enzymatische Apparat, mit dessen Hilfe die Zelle aus etwa 20 Aminosäuren Proteine synthetisiert, hat zwei Aufgaben zu lösen:

- 1.) Er hat die Energie bereitzustellen, die zur Schließung der α -Peptidbindung zwischen freien Aminosäuren aufzuwenden ist.

- 2.) Er hat die Spezifität zu liefern bzw. zu übertragen, die für die Biosynthese von Peptidketten definierter Aminosäuresequenz und ihr Zusammenfügen zu in bestimmter Weise gefalteten Eiweißmolekülen erforderlich ist.

Lange Zeit war angenommen worden, daß die Proteinbiosynthese eine Umkehr der Proteolyse unter Beteiligung proteolytischer Enzyme darstellt. Borsook und Dubnoff (2) konnten jedoch zeigen, daß dies thermodynamisch unwahrscheinlich ist. Die Knüpfung von Peptidketten aus freien Aminosäuren ist nämlich stark endergonisch. In der Folge postulierten Lipmann und andere (3,4) die Bildung an der Carboxyl- oder Aminogruppe aktivierter Zwischenverbindungen aus den Aminosäuren. Diskutiert wurden besonders Phosphorsäureamide und gemischte Anhydride aus Aminosäure und Phosphorsäure. Aber erst die Einführung der Isotopentechnik machte die experimentelle Prüfung des Mechanismus der Proteinbiosynthese möglich.

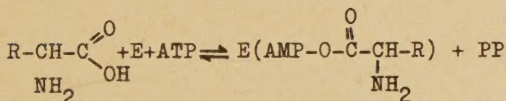
Die Isolierung zellfreier, "definierter" Enzymsysteme, die die Fähigkeit zum Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren

in ihr Protein besitzen, führte in den letzten Jahren zur Auflösung des Gesamtvorganges in nacheinander ablaufende Einzelschritte. Ob das Einbauvermögen derartiger Systeme allerdings als Kriterium für das Stattfinden einer Eiweißnettosynthese benutzt werden darf, ist für jeden Einzelfall durch Nachweis eines meßbaren Mengenzuwachses an Protein zu klären. Dieses Problem ist noch nicht endgültig gelöst. Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen haben zur Aufstellung des folgenden Schemas der Proteinbiosynthese geführt:

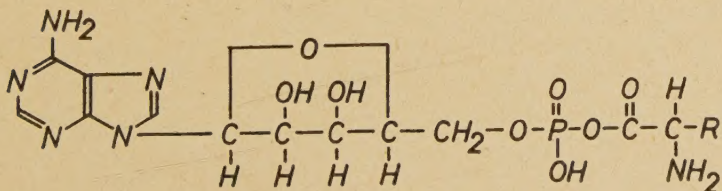
- a) Aktivierung der Aminosäuren,
- b) Transport der aktivierten Aminosäuren zum Syntheseort,
- c) Synthese von Peptidketten spezifischer Aminosäuresequenz,
- d) Ablösung der Peptidketten vom Syntheseort und Zusammenfügen zum spezifisch "gefalteten" Protein.

a) Aktivierung

Aminosäureaktivierende Enzyme bilden aus l-Aminosäuren und Adenosintriphosphat (ATP) unter Eliminierung von Pyrophosphat gemischte Anhydride, sog. Aminoacyladenylate (5,6,7). Auf diese Weise wird die Energie der α -Pyrophosphatbindung des ATP für die später ablaufenden Vorgänge, die schließlich zur Knüpfung von Peptidketten führen, bereitgestellt.



E = aktivierendes Enzym; ATP = Adenosintriphosphat;
AMP = Adenosinmonophosphat; PP = Pyrophosphat.

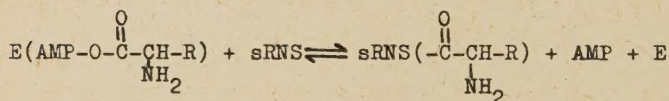


Aminoacyladenylat

Die Aminoacyladenylate sind sehr fest und stöchiometrisch an die Enzyme gebunden. Es scheint für jede Aminosäure ein spezifisches Enzym zu geben. So konnten aus Mikroorganismen und Warmblütergeweben Enzyme isoliert bzw. angereichert werden, die Tryptophan (8,9), Methionin (10), Threonin und Serin (9), Tyrosin (11,12) und Alanin (13) aktivieren.

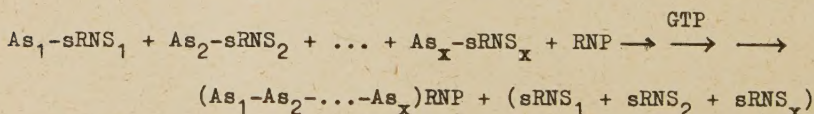
b) Transport

Die aktivierenden Enzyme befinden sich bei Säugetiergeweben im partikelfreien Anteil des Zellplasmas. Die Proteinsynthese, oder zumindest der Einbau der Aminosäuren in Peptidketten erfolgt jedoch vorwiegend in den Ribonukleoprotein-Partikeln des endoplasmatischen Retikulums. Wie gelangen die Aminosäuren aus dem Zellplasma zum Syntheseort? Mehrere Befunde (14-21) deuten darauf hin, daß nicht der hochmolekulare Komplex aus Enzym und Aminoacyladenylat, sondern eine relativ niedermolekulare Ribonukleinsäure (sRNS) aus dem Cytoplasma die Transportfunktion erfüllt. Dabei wird offenbar der Aminoacylrest unter Freisetzung von AMP vom Aminoacyladenylat auf diese sog. sRNS übertragen:



c) Einbau in Peptidketten spez. Aminosäuresequenz

Der Aminoacylrest des sRNS-Komplexes wird in Gegenwart von Guanosintriphosphat (GTP) in die Peptidketten der Ribonukleoprotein- (RNP-) Partikel eingebaut. Der Vorgang läßt sich mit Vorbehalt wie folgt formulieren:



Die RNP-Partikel ($\emptyset$ ca. 80-150 Å) sind in Säugetierzellen Strukturelemente des endoplasmatischen Retikulums, aus welchem beim Homogenisieren die sog. Mikrosomen entstehen.

Zur Frage der Spezifität in der Proteinbiosynthese gibt es verschiedene Vorstellungen, jedoch nur wenige Befunde. Besonders über die Funktion der Nukleinsäuren als Matrizen ist viel diskutiert worden. Es gibt verschiedene Hinweise, daß hochmolekulare, spezifische Nukleinsäuren die "Information" auf das in Synthese begriffene Protein übertragen. So ist die hochmolekulare Ribonukleinsäure (RNS) mit einem Molgewicht von ca. 2×10^6 aus RNS-haltigen Viren für sich allein infektiös (22,23). Auch bei der Infektion von Bakterien durch Phagen überträgt die Phagen-DNS allein die für die Phagenvermehrung notwendige Information (1). Ferner läßt sich durch hochmolekulare RNS die Fähigkeit zur Synthese adaptiver Enzyme von adaptierten auf nicht adaptierte Bakterienkulturen übertragen (24,25). Es gibt jedoch bisher noch keine experimentellen Befunde, die zeigen, daß die hochmolekulare RNS der RNP-Partikel oder vielleicht auch die relativ niedermolekulare sRNS eine Kontrolle über die Proteinspezifität ausüben.

d) Ablösung und Faltung

Über die Ablösung der Peptidketten vom Syntheseort und deren spezifische Faltung gibt es noch kein klares experimentelles Material, so daß sich eine Besprechung in diesem Rahmen erübrigt.

Für die Lösung der zahlreichen noch ungeklärten Probleme ist die Isolierung möglichst übersichtlicher und "definierter" in vitro-Systeme erforderlich, an denen die einzelnen an der Proteinbiosynthese beteiligten Reaktionsmechanismen studiert werden können. So sind seit den grundlegenden Arbeiten von Zamecnik et al. (26-29), die an fraktionierbaren

Rattenleberhomogenaten durchgeführt wurden, zahlreiche zellfreie Systeme beschrieben worden, in denen radioaktiv markierte Aminosäuren ins Protein eingebaut werden (30-33). Ein viel bearbeitetes Objekt zum Studium der Proteinbiosynthese stellen seit langem Bakterien dar. Bei den aus diesen bisher gewonnenen "in vitro-Systemen", an denen Gale und Folkes, Spiegelmann, Nissmann u.a. (34-42) den Einbau markierter Aminosäuren studierten, handelt es sich entweder um grobpartikuläre Bakterienbruchstücke oder sog. Protoplasten (43), welche ihrer Zellwand beraubte Zelleiber darstellen. Der Nachteil derartiger Präparationen besteht in ihrem komplexen Charakter, der die biochemische Analyse erschwert. Aus Bakterien wurde bisher kein "lösliches", fraktionierbares Einbausystem isoliert, an dem die Gesamtheit der an der Proteinbiosynthese beteiligten Einzelschritte studiert werden konnte. An zellfreien Bakterienextrakten wurden nur Teilreaktionen, wie die Aktivierung der Aminosäuren (6,44,45), näher untersucht. Das ist offenbar zum Teil auf das Fehlen eines sauberen und milden Homogenisierungsverfahrens zurückzuführen, das unerwünschte Veränderungen der freigesetzten Strukturen ausschließt.

Zur Gewinnung von Bakterienhomogenaten wurde in der vorliegenden Arbeit ein in unserem Laboratorium in Weiterentwicklung eines bekannten Prinzips konstruierter Vibrationshomogenisator verwendet. Dieser gestattete den Aufschluß relativ großer Mengen von Zellsuspensionen unter kontrollierten milden Bedingungen.

Im folgenden wird über die Isolierung und Charakterisierung zweier zellfreier, fraktionierbarer Systeme aus Homogenaten von *Escherichia coli* B berichtet, die den Einbau radioaktiv markierter Aminosäure ins Protein nukleinsäurehaltiger Strukturen katalysieren und möglicherweise an der Proteinbiosynthese beteiligt sind.

Allgemeiner Teil

I Methoden

A Gewinnung der Bakterien

Die Bakterien (E. coli B) wurden in Nährbouillon unter Belüftung bei 37°C gezüchtet, gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert, zweimal mit Puffer (s.u.) gewaschen und bei 0°C als Sediment bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Ausbeute beträgt etwa 2,5 g Bakterien pro Liter Nährmedium.

B Homogenisieren der Bakterien

Die Gewinnung von Zellfraktionen aus Bakterien wurde nach zahlreichen Verfahren erprobt, z.B. durch Zerreiben der Bakterien mit Quarz-, Aluminium- und Carborundpulver, plötzliche starke Druckänderungen, enzymatischen Abbau der Zellmembranen und Ultraschall. Erst ein in unserem Laboratorium in Variation eines bekannten Prinzips konstruierter Vibrator (46,47) gestattete die Gewinnung von Homogenaten bei konstanter Temperatur und hoher Ausbeute.

a) Aufbau und Arbeitsweise des Homogenisationsvibrators

Ein vertikal stehender Becherhalter wird durch einen regelbaren 70-Watt Elektromotor (Drehzahl ca. 3500 Upm) über einen Exzenter in vertikale Schwingungen mit einer Frequenz von ca. 50 Hertz versetzt. Der Becherhalter dient der Aufnahme von V2A-Bechern, in denen sich das mit Glasperlen vermischte Versuchsgut befindet. Er ist von einem

Kühlmantel umgeben, durch den Eiswasser gepumpt wird, so daß die Bakterien bei konstanter Temperatur (etwa 4°C) zertrümmert werden. Die bei der hochtourigen Vibration auftretenden mechanischen Kräfte zerstören die Zellmembranen der Bakterien, so daß der Zellsaft freigelegt wird. Der Homogenisierungseffekt wächst bei konstanter Zeit proportional der Zahl der Stöße mit der Drehzahl und der Anzahl der Glaskügelchen. Zur Zertrümmerung von *E. coli*-Zellen erwiesen sich Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,1 mm am wirksamsten.

b) Gewinnung des Bakterienhomogenates

10 g Bakterien (Naßgewicht) wurden in 20 cm³ saccharosefreien Phosphat-Puffer (0,035 m Na₂HPO₄; 0,025 m KCl; 0,004 m MgCl₂; pH = 6,9) suspendiert, mit 45 cm³ Glaskügelchen ($\varnothing$ 0,1 mm) versetzt und 15 Minuten im Vibrator geschüttelt. Die zertrümmerten Bakterien (Zerstörungsgrad ca. 90 %) wurden anschließend durch Absaugen auf einer Glasfilternutsche (G 2 von Schott u. Gen.) von den Glasperlen abgetrennt. Nach Waschen der Glasperlen mit weiteren 30 cm³ frischen Puffers war die Ausbeute nahezu quantitativ.

C Fraktionierung des Homogenates (s. Schema S. 10)

Die Fraktionierung des Homogenates diente der Entfernung noch darin enthaltener intakter Bakterien, der Herausschälung der für den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren notwendigen Bestandteile und der Zerlegung des Gesamtsystems in Teilreaktionen katalysierende Komponenten. Sie wurde vorwiegend durch differentielle Ultrazentrifugation, daneben durch freie Elektrophorese und durch Verwendung einer Phenolmethode (48) erzielt.

a) Gewinnung der Debris-Fraktion: Das durch die Waschflüssigkeit verdünnte Bakterienhomogenat wurde in der Spinco-Ultrazentrifuge (Modell E) 15 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert, wobei ein zweischichtiges Sediment und ein

visköser, opaler Überstand ($\bar{U}$ -20.000 g) entstanden. Das Sediment wurde in 30 cm³ Phosphat-Puffer resuspendiert. Diese aus Bakterienbruchstücken und ganzen Bakterien bestehende Suspension wurde einer mehrmaligen niedertourigen Zentrifugation im Rotor No.30 der Spinco-Ultrazentrifuge unterworfen, um noch vorhandene intakte Bakterien zu entfernen:

- 1.Zentrifugation: 10 Minuten bei 3500 Upm. Die oberen zwei Drittel des Überstandes wurden abgezapft, mit Puffer auf das Ausgangsvolumen verdünnt und einer
- 2.Zentrifugation unterworfen, und zwar 10 Minuten bei 2800 Upm. Die oberen zwei Drittel des Überstandes wurden wiederum abgezapft und auf das Ausgangsvolumen verdünnt. Es wurde auf dieselbe Weise eine
- 3.und 4.Zentrifugation jeweils 10 Minuten bei 2800 Upm angeschlossen.

Nach der letzten niedertourigen Zentrifugation wurden die oberen zwei Drittel des Überstandes 15 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Das dabei entstehende Sediment stellt die Debris-Fraktion dar, welche noch zweimal mit Phosphat-Puffer gewaschen wurde.

- b) Gewinnung eines 1-Std-105.000-Überstandes ($\bar{U}_{1h}$) und eines 1-Std-105.000 g-Sedimentes (Sed_{1h}): Der aus dem Bakterienhomogenat nach 15minütiger Zentrifugation bei 20.000 g erhaltene Überstand ($\bar{U}_{20.000\text{ g}}$) wurde eine Stunde bei 105.000 g zentrifugiert. Das entstehende gelatinöse Sediment wird als 1-Std-Sediment (Sed_{1h}), der opale und visköse Überstand als 1-Std-Überstand ($\bar{U}_{1h}$) bezeichnet.
- c) Gewinnung eines 14-Std-105.000 g-Überstandes; ($\bar{U}_{14h}$) und eines 14-Std-105.000 g-Sedimentes (Nukleoproteid-(NP-)) Fraktion: Zur weiteren Fraktionierung wurde der 1-Std-Überstand ($\bar{U}_{1h}$) einer 14stündigen Zentrifugation bei 105.000 g unterworfen, wobei sich ein gelatinöses, zweischichtiges Sediment (trübe, gelbbraune Unterschicht und klare Oberschicht) und ein im Gegensatz zum 1-Std-Überstand leichtflüssiger Überstand bildete. Der Überstand wird als 14-Std-Überstand ($\bar{U}_{14h}$), das Sediment als Nukleoproteid-(NP-)Fraktion bezeichnet.

Alle Operationen zur Gewinnung der Fraktionen wurden im Kühlraum zwischen 0° und 4°C ausgeführt.

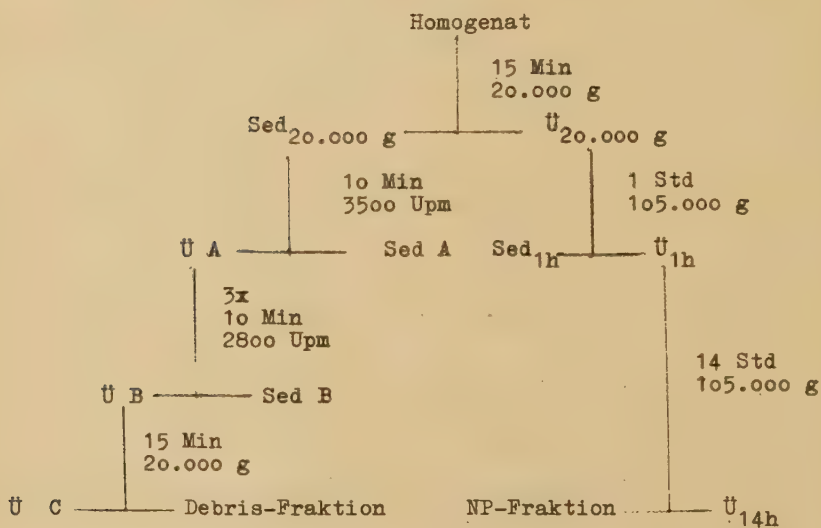
Nach Korrektur für die im Verlauf der Fraktionierung auftretenden Verluste findet man auf ein Gramm Bakterien (Trockengewicht):

500 mg Debris-Fraktion

260 mg NP-Fraktion

240 mg $\bar{U}_{14h}$

Schematische Darstellung der Fraktionierung



D Einbauversuche

Je nach Versuchszweck wechselnde Kombinationen der einzelnen Fraktionen wurden mit oder ohne Zusatz von Cofaktoren und Subfraktionen in 1 ml Medium zumeist bei pH 6,9 mit 0,05 bis 0,2 μ M dl-Leucin-1- C^{14} (spez. Aktivität 5 μ C/ μ Mol) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurde die enzymatische Reaktion durch schnelles Abkühlen auf 0°C abgestoppt. Die einzelnen Ansätze wurden mit 1 ml Wasser

verdünnt und mit je 2 ml 10 %iger Trichloressigsäure versetzt, wobei das Protein ausflockt.

- a) Bestimmung in das Protein eingebauter radioaktiv markierter Aminosäuren. Um das nach der Trichloressigsäurebehandlung ausgeflockte Protein von anhaftender, nicht eingebauter radioaktiv markierter Aminosäure zu befreien und Lipid und Nukleinsäuren daraus zu entfernen, wurde nach einer von Siekevitz (49) angegebenen Vorschrift verfahren:

Der ausgefällte Niederschlag wurde zweimal mit kalter 4 %iger Trichloressigsäure gewaschen, dann 15 Minuten mit heißer Trichloressigsäure bei 95°C behandelt, um die Nukleinsäure zu entfernen. Der abzentrifugierte nukleinsäurefreie Niederschlag wurde zur Lipidentfernung zunächst 15 Minuten mit heißem Aethanol, danach zweimal kürzere Zeit (ca. 5 Minuten) mit einem Aethanol-Aether-Chloroform-Gemisch (2:2:1) behandelt, anschließend mit Aether getrocknet.

Das getrocknete Protein wurde in 98 %iger Ameisensäure gelöst, auf gewogene Aluminiumplättchen aufgebracht, getrocknet, gewogen und in einem SC-16-Glasflowcounter der Firma Tracerlab gezählt. Die angegebenen Teilchen pro Minute sind nach Abzug des Untergrundes durch Anbringen einer Korrektur für die Selbstabsorption auf unendlich dünne Schichtdecke berechnet worden.

- b) Zusammensetzung des zum Homogenisieren der Bakterien und zur Inkubation verwendeten Puffers.

0,035 m Na_2HPO_4 ; 0,025 m KCl; 0,04 m MgCl_2 ; pH = 6,9.

Das pH wurde mit verdünnter Salzsäure auf 6,9 eingestellt. Am Anfang der Untersuchungen wurde dem Puffer noch Saccharose (0,25 m) zugesetzt. Es erwies sich jedoch später, daß auch ohne ihren Zusatz die gleichen Ergebnisse erzielt wurden.

Zur Inkubation der bakterienfreien Fraktionen wurde nur sterilisierter Puffer verwendet.

E Chemische Analysen

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Verfahren von Lowry et al. (50). Die säurelöslichen Nukleotide wurden im Überstand der durch kalte 5 %ige Trichloressigsäure erhaltenen Fällung spektrophotometrisch bestimmt. Die Gesamtnukleinsäure wurde durch 15minutige Behandlung des Sedimentes mit 5 %iger Trichloressigsäure bei 95°C in Lösung gebracht und im Überstand spektrophotometriert. Der Desoxyribonukleinsäuregehalt wurde nach dem Verfahren von Dische mit Diphenylamin-Reagenz ermittelt (51).

F Physikalische Methoden

- a) Ultrazentrifugation: Für präparative Zwecke wurde eine Spinco-Modell-L-Ultrazentrifuge benutzt. Für analytische Läufe stand eine luftgetriebene Ultrazentrifuge der Firma Phywe (Modell 1957) mit Philpot-Svensson-Optik zur Verfügung.
- b) Elektrophorese: Für elektrophoretische Trennungen nach dem Verfahren von Tiselius wurde ein Gerät der Firma Phywe verwendet.
- c) Elektronenmikroskopie: Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Elmiskop 1 der Firma Siemens ausgeführt.

II Beschreibung und Deutung der Versuchsergebnisse

A Charakterisierung der Fraktionen

a) Debris-Fraktion

Im Phasenkontrastmikroskop sind bei 2.000facher Vergrößerung zwei verschiedene Arten von Teilchen erkennbar: kontrastarme Partikel undeutlicher und ungleichmäßiger Kontur, deren Größe schwer abzuschätzen ist, daneben in weitaus geringerer Menge kontrastreiche, dunkel erscheinende runde

Teilchen von 0,1 bis 0,5 μ Querschnitt. Elektronenmikroskopisch sieht man bei 2.500facher Vergrößerung hauptsächlich kontrastarme Teilchen verschiedener Größe von runder und ovaler Kontur, deren Durchmesser kleiner als 1 μ ist. Daneben sind kontrastreiche Teilchen mit bizarren Oberflächenkonturen in sehr unterschiedlicher Größenordnung zu sehen (s. Abb. 1). Es kann noch nicht gesagt werden, welchen Strukturelementen der Bakterienzelle diese Teilchen zuzuordnen sind. Wahrscheinlich handelt es sich größtenteils um Membranbruchstücke, daneben vielleicht um membranöse Elemente aus dem Inneren der Bakterienzelle.



Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Debris-Fraktion (rechte Bildhälfte) und von E-coli B-Zellen (linke Bildhälfte)
Vergrößerung: 2500x
Unbedampft

Ein Gramm des Materials enthält:

700 mg Protein, 3 mg RNS, DNS in Spuren

Die Debris-Fraktion enthält aktivierende Enzyme für sämtliche Aminosäuren. Sie baut in Gegenwart von Cofaktoren und 14 Std-Überstand ($\text{Ü}_{14\text{h}}$) radioaktiv markierte Aminosäuren in das Protein ein.

b) 1 Std-105.000 g-Überstand ($\bar{U}_{1h}$)

Im Sedimentationsbild des 1 Std-Überstandes lassen sich reproduzierbar 5 Gradienten (1-5) erkennen (s.Abb.2). Die Gradienten 1-3 verschwinden nach Behandlung mit Ribonuklease (s.Abb.3). Die ihnen entsprechenden Komponenten lassen sich durch 14stündige Zentrifugation bei 105.000 g abschleudern. Aus der Analyse des isolierten Materials geht hervor, daß es sich um Ribonukleoprotein-(RNP-)Partikel handelt, die je ungefähr 50 Gewichtsprozent Protein und Ribonukleinsäure enthalten. Der Gradient 4 kann durch Desoxyribonuklease eliminiert werden. Er zeigt den für hochmolekulare Desoxyribonukleinsäure charakteristischen Selbstschärfungseffekt. Es handelt sich demnach um eine Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder ein Desoxyribonukleoprotein (DNP). Durch 14stündige Zentrifugation bei 105.000 g läßt sich diese DNS-haltige Fraktion abschleudern.

Der uneinheitliche Gradient 5 kann wohl im wesentlichen Protein und Polynukleotiden mit Molekulargewichten kleiner als 100.000 zugeordnet werden.

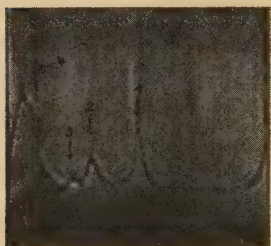


Abb. 2: Sedimentationsbild eines 1 Std-Überstandes.

Laufzeit: 20 Min. bei 180.000 g in der analytischen Ultrazentrifuge.

1, 2 und 3: RNP-Partikel

4: DNS-Fraktion

5: im wesentlichen Protein und Polynukleotide



Abb. 3: Sedimentationsbild eines 1 Std-Überstandes, welcher 6 Std. bei 40°C mit 25 µg RNase/ml inkubiert wurde.

Laufzeit: 30 Min. bei 180.000 g in der analytischen Ultrazentrifuge.

Phenolspaltung des 1 Std-105.000 g-Überstandes

Die nach der Methode von Schuster, Schramm und Zillig (48) durch zweimaliges Ausschütteln mit Phenol in der Kälte gewonnene, durch Ausäthern von Phenol befreite, wässrige Phase läßt im Sedimentationsbild 3 Komponenten (1-3) erkennen (s.Abb.4).

Bei den Komponenten 1 und 2 handelt es sich um hochmolekulare, sehr labile Ribonukleinsäuren (RNS I und II), bei der Komponente 3 um eine Desoxyribonukleinsäure (DNS_p).

Das Verhältnis der Konzentrationen und Sedimentationsgeschwindigkeiten von RNS I und II entspricht etwa dem von RNP I und II im $\bar{U}_{1h}$. Es liegt daher nahe, die beiden Ribonukleinsäuren den Ribonukleoproteidpartikeln zuzuordnen.

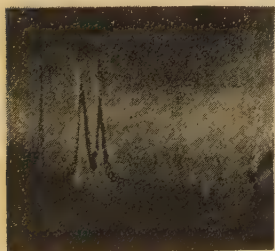


Abb. 4: Sedimentationsbild einer nach einer Phenolmethode (32) aus dem 1 Std-Überstand gewonnenen Nukleinsäure.

Laufzeit: 30 Min. bei 180.000 g in der analytischen Ultrazentrifuge.

1 und 2: RNS I und II

3: DNS

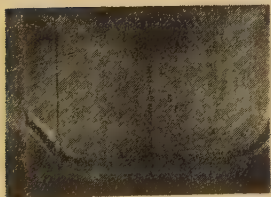


Abb. 5: Sedimentationsbild einer nach einer Phenolmethode (32) aus dem 1 Std-Überstand gewonnenen Nukleinsäure, welche 30 Min. bei 4 °C mit 25 µg RNase/ml inkubiert wurde.

Laufzeit: 20 Min. bei 180.000 g in der analytischen Ultrazentrifuge.

In Tabelle 1 sind die auf $C = 0$ extrapolierten Svedberg-Konstanten der einzelnen Komponenten des $\bar{U}_{1h}$ und der Phenol-Nukleinsäure zusammengestellt.

Tabelle 1

	Gradien- ten	Komponenten	S ₂₀ für C=O in Svedberg	Mol.-Gew. (x10 ⁶)
1 Std-105.000 g- Überstand	1	RNP I	48,8	1,2
	2	RNP II	29,9	0,6
	3	RNP III	27,2	
	4	DNS (od.DNP)	25,5	11
	5	Protein + RNS	5	0,1
Phenol-NS	1	RNS I	19,4	0,6
	2	RNS II	14,5	0,3
	3	DNS _p	7,6	0,4

Für die RNP-Partikel lassen sich daraus unter der elektronenmikroskopisch wahrscheinlich gemachten Annahme (s.Abb.7), daß die Teilchen rund und kompakt sind, die ebenfalls in Tabelle 1 angegebenen Molekulargewichte berechnen. Aus dem durch Analyse ermittelten RNS-Gehalt der Partikel ergeben sich dann zwangsläufig die in der Tabelle angegebenen Molekulargewichte für RNS I und II.

Die Molekulargewichte der DNS in beiden Fraktionen wurden nach einer von Doty (52) für Thymus-DNS angegebenen Formel berechnet. Die Phenolbehandlung bewirkt demnach offenbar eine Desaggregation der zunächst sehr hochmolekularen DNS des 1 Std-Überstandes. Ursache kann sowohl die Entfernung von Protein als auch die Sprengung von Wasserstoffbrücken sein.

Die einzelnen Komponenten des 1 Std-Überstandes lassen sich auch durch Elektrophorese in der Tiseliusapparatur voneinander trennen. Das Verfahren ist besonders für die präparative, kathodische Abtrennung nukleinsäurefreien Proteins geeignet (s.Abb.6).

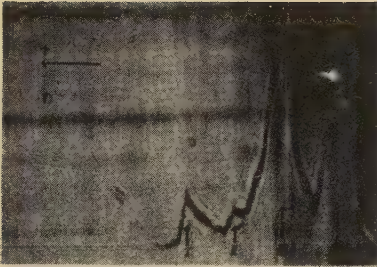


Abb. 6: Elektrophorese-Bild
eines 1 Std-Überstandes in
Phosphatpuffer bei pH = 6,9
I: DNS II: RNS
III: RNP-Partikel
IV: Protein

c) Nukleoproteid-(NP-)Fraktion

Bei dieser Fraktion handelt es sich um das Sediment, welches nach 14stündiger Zentrifugation bei 105.000 g aus dem 1 Std-Überstand erhalten wird. Die Nukleoproteid-Fraktion enthält also die den Gradienten 1-4 im Sedimentationsbild des 1 Std-Überstandes (s.Abb.2) zuzuordnenden Komponenten. Diese sind die RNP-Fraktionen I bis III und die DNS- (bzw. DNP-)Fraktion. Elektronenmikroskopisch stellen die RNP-Fraktionen I bis III bei 20.000facher Vergrößerung runde und kompakte Partikel dar (s.Abb. 7), die den von Schachmann et al. bereits beschriebenen entsprechen (53).

Ebenso wie die Debris-Fraktion baut die NP-Fraktion in Gegenwart von 14 Std-Überstand und Cofaktoren radioaktiv markiertes Leucin ins Protein ein.



Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Ribonukleoproteid-Partikeln einer Nukleoproteid-Fraktion.

Vergrößerung: 20.000x
Im Winkel von 30° mit Platin schräg bedampft.

d) 14 Std-105.000 g-Überstand ($\bar{U}_{14h}$)

Der nach 14stündiger Zentrifugation bei 105.000 g aus dem 1 Std-Überstand erhaltene 14 Std-Überstand enthält 84 % Protein und 5 % RNS. Er ist frei von Ribonukleoproteid-Partikeln und DNS (s.Abb. 8). Das Protein läßt sich in der Tiselius-Elektrophorese von der viel schneller wandernden Nukleinsäure abtrennen (s.Abb. 6).

Die Ribonukleinsäure ist im Vergleich zur Phenol-RNS aus den RNP-Partikeln niedermolekular, aber zum großen Teil nicht dialysierbar. Durch Schütteln mit Phenol läßt sie sich, zusammen mit anderen in der wässrigen Phase verbleibenden Substanzen, vom Phenol befreien.

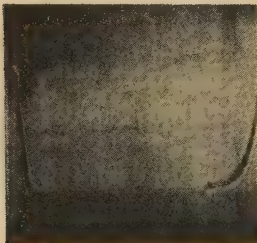


Abb. 8: Sedimentationsbild eines 14 Std-Überstandes.
Laufzeit: 30 Min. bei 180.000 g
5: im wesentlichen Protein und Polynukleotide

Niedermolekulare Cofaktoren lassen sich aus der $\bar{U}_{14h}$ nur schwer durch Dialyse, dagegen jedoch unter erheblichen Verlusten von Protein und RNS, durch isoelektrische Fällung bei pH = 4 recht gut entfernen.

Der 14 Std-Überstand enthält aktivierende Enzyme für 10 Aminosäuren, unter anderen Leucin (55,44).

In Gegenwart von Cofaktoren katalysiert er den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in das Protein der Debris- und Nukleoproteid-Fraktion.

pH 4-Fraktion

Der 14 Std-Überstand wird mit verdünnter Essigsäure auf pH = 4 gebracht, und der ausflockende Niederschlag abzentrifugiert. Er wird zweimal in Neutralpuffer wieder aufgenommen und erneut bei pH = 4 ausgefällt. Dieses Präzipitat wird als pH 4-Fraktion bezeichnet. Es wird zum Gebrauch in neutralem Phosphatpuffer gelöst.

Die pH 4-Fraktion besteht zu 90 % aus Protein, zu 10 % aus Ribonukleinsäure.

B Nachweis eines Einbausystems für Leucin- $l\text{-C}^{14}$ in der Debris-Fraktion

Wie Experiment 1 zeigt, ist nach Inkubation der Debris-Fraktion mit radioaktiv markiertem Leucin dieses nur in geringer Menge eingebaut worden. Auch Zusatz von ATP oder GTP läßt den Einbau nicht ansteigen. Erst Zusatz von 14 Std-Überstand zur Debris-Fraktion stimuliert den Einbau beträchtlich, und Zusatz von ATP oder GTP läßt jenen dann nochmals stark ansteigen. Durch Zusatz von Ribonuklease läßt sich der Einbau nahezu vollständig unterbinden.

Experiment 1

Fraktionen und Zusätze			Einbau (T.p.m.)
Debris			19
"		+ ATP (GTP)	19
"	+ $\bar{U}_{14h}$		172
"	+ $\bar{U}_{14h}$	+ ATP	345
"	+ $\bar{U}_{14h}$	+ GTP	330
"	+ $\bar{U}_{14h}$	+ ATP + RNase	25
$\bar{U}_{14h}$		+ ATP	23

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

ATP: 5 μ m

Inkubationsvolumen: 1 ml

GTP: 5 μ m

Debris: 1 mg

RNase: 2,5 μ

$\bar{U}_{14h}$: 1 mg

d,l-Leucin-1-C¹⁴: 0,05 μ m/Röhrch. Einbau: die Zahlen geben die gezählten Teilchen pro Minute an (T.p.m.)

Um genauer zu untersuchen, welche Komponenten im 14 Std-Überstand für den einbausteigernden Effekt verantwortlich sind, muß zunächst geklärt werden, ob es sich um niedermolekulare oder um undialysable hochmolekulare Faktoren handelt. Da sich durch Dialyse die niedermolekularen Komponenten nur schwer vollständig aus dem 14 Std-Überstand entfernen lassen, wurde versucht, durch isoelektrische Fällung mit verdünnter Essigsäure bei pH 4 aus diesem eine von niedermolekularen Co-faktoren freie Fraktion zu erhalten.

Experiment 2 zeigt, daß diese pH 4-Fraktion (s.o., S. 19) die für den Einbau notwendigen hochmolekularen Faktoren enthält. Denn ohne Zusatz der pH 4-Fraktion zur Debris-Fraktion ist trotz ATP-Zugabe der Einbau nur sehr gering. Inkubation der Debris-Fraktion mit der pH 4-Fraktion und ATP läßt dagegen den Einbau sehr deutlich hochschnellen.

Die für den Einbau unbedingt notwendige pH 4-Fraktion besteht zu 90 % aus Protein, zu 10 % aus RNS. Welche der beiden Komponenten ist nun für den Einbau erforderlich, oder sind es beide? Um diese Frage zu klären, wurde aus dem 14 Std-Überstand die Ribonukleinsäure nach der Phenolmethode von Schuster, Schramm und Zillig (48) isoliert.

Experiment 2

Fraktionen und Zusätze			Einbau (T.p.m.)
Debris			19
"		+ ATP	19
"	+ pH 4-Fraktion		30
"	+ pH 4-Fraktion	+ ATP	195
"	+ pH 4-Fraktion	+ ATP + RNase	0
pH 4-Fraktion		+ ATP	0

Inkubation: 1 Std. bei 37°C ATP: 5 µm
 Inkubationsvolumen: 1 ml RNase: 2,5 µg
 Debris: 1 mg
 pH 4-Fraktion: 0,5 mg
 d,l-Leucin-l-C¹⁴: 0,05 µm/Röhrchen

Aus Experiment 3 geht hervor, daß neben ATP nur der Zusatz der RNS aus dem 14 Std-Überstand notwendig ist, damit ein Einbau in das Protein der Debris-Fraktion stattfindet.

Experiment 3

Fraktionen und Zusätze			Einbau (T.p.m.)
Debris		+ ATP	2
"	+ RNS	+ ATP	80
"	+ RNS	+ Ü _{14h} + ATP	187
"		+ Ü _{14h} + ATP	53

Inkubation: 1 Std. bei 37°C in allen Röhrchen: 2,5 µm ATP
 Inkubationsvolumen: 1 ml 0,05 µm d,l-Leucin-l-C¹⁴
 pH: 6,9
 Debris: 1,5 mg
 RNS: 0,04 mg
 Ü_{14h}: 0,8 mg

Um festzustellen, ob andere Nukleosidtriphosphate das ATP im Einbausystem ersetzen können bzw. ob noch andere Triphosphate notwendige Komponenten des Systems sind, wurde als einziges verfügbares das Guanosintriphosphat (GTP) getestet.

Experiment 4

Fraktionen und Zusätze				Einbau (T.p.m.)
Debris	+ pH 4-Fraktion			23
"	+ pH 4-Fraktion	+ ATP		81
"	+ pH 4-Fraktion	+ GTP		77

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

ATP: 2,5 μ m

Inkubationsvolumen: 1 ml

GTP: 2,5 μ m

Debris: 1 mg

d,l-Leucin-1-C¹⁴: 0,05 μ m/
Röhrchen

pH 4-Fraktion: 0,3 mg

Experiment 5

Fraktionen und Zusätze				Einbau (T.p.m.)
Debris	+ pH 4-Fraktion			14
"	+ pH 4-Fraktion	+ ATP		41
"	+ pH 4-Fraktion	+ GTP		15
"	+ pH 4-Fraktion	+ ATP + GTP		47

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

ATP: 1,25 μ m

Inkubationsvolumen: 1 ml

GTP: 0,25 μ m

Debris: 0,5 mg

d,l-Leucin-1-C¹⁴: 0,05 μ m/
Röhrchen

pH 4-Fraktion: 0,3 g

GTP vermag also das ATP zu ersetzen, und zwar stimulieren entsprechende Mengen den Einbau im gleichen Grade (Exp.4).

GTP in geringer Konzentration dem ATP zugesetzt, bewirkt keine signifikante zusätzliche Einbauerhöhung (Exp. 5).

Es ließ sich also kein absolutes Erfordernis für ATP bzw. GTP oder für ATP und GTP nachweisen, sondern es ist nur Zusatz eines dieser beiden Triphosphate notwendig.

Der Einbau ist von der Konzentration der zugesetzten Nukleosid-triphosphate abhängig. Tabelle 2 zeigt, daß er zunächst bis zu einer Triphosphatkonzentration von etwa 5 μ m ansteigt und dann bei höheren Konzentrationen inhibiert wird.

Tabelle 2

$\mu\text{m ATP (GTP)}$	Debris + pH 4-Fraktion + ATP	+ GTP
0	23	23
0,5	-	72
1,0	61	77
2,5	81	87
5,0	91	115
10,0	41	30

Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die gezählten Teilchen pro Minute an.

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

Debris: 1 mg

Inkubationsvolumen: 1 ml

pH 4-Fraktion: 0,3 mg

d,l-Leucin- 1-C^{14} : 0,05 μm /
Röhrchen

Der zeitliche Verlauf des Einbaus wird in Abbildung 9 dargestellt. Man erkennt, daß er zunächst linear ansteigt und in Gegenwart von 2,5 μm Nukleosidtriphosphat nach etwa 90 Minuten seinen Sättigungswert erreicht.

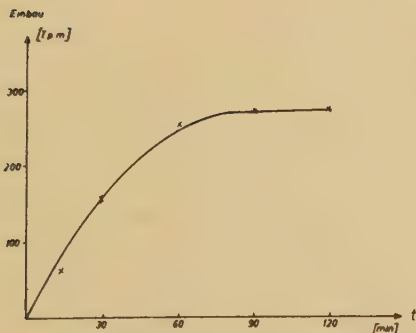


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf des Einbaus von Leucin- 1-C^{14} ins Debris-System (Debris-Frakt. + $\text{Ü}_{14\text{h}}$ + ATP).
Debris: 1 mg $\text{Ü}_{14\text{h}}$: 1 mg
ATP: 2,5 μm
Leucin- 1-C^{14} : 0,1 μm
Inkubation: bei 37°C in 1 ml-Ansätzen

Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, daß das Einbauma^ximum bei pH 7,5 liegt, und bei niederen und höheren pH-Werten das Einbauvermögen stark abnimmt.

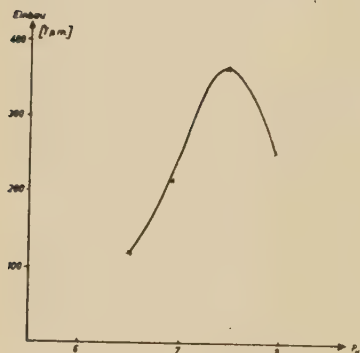


Abb. 10: pH-Abhängigkeit des Einbaus von Leucin-1-C¹⁴ ins Debris-System.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C
in 1 ml-Ansätzen

Debris: 1,2 mg

U¹⁴h: 1 mg

ATP: 2,5 µm

Leucin-1-C¹⁴: 0,1 µm

C Nachweis eines Einbausystemes für Leucin-1-C¹⁴ im 1 Std-105.000 g-Überstand (Nukleoproteid-Einbausystem)

Während das beschriebene Debris-Einbausystem grobpartikulär ist, wird im folgenden über die Isolierung und Eigenschaften eines relativ niedermolekularen Systems berichtet, welches sich im 1 Std-Überstand befindet.

Wie Experiment 6 zeigt, wurde nach Inkubation des undialysierten 1 Std-Überstandes mit radioaktivem Leucin dieses in das Protein eingebaut. Der Einbau ließ sich durch Zusatz von ATP bzw. GTP steigern und durch Ribonuklease-Zusatz völlig unterbinden.

Experiment 6

Fraktionen und Zusätze		Einbau (T.p.m.)
$\bar{U}_{1h}$		161
$\bar{U}_{1h}$	+ ATP	270
$\bar{U}_{1h}$	+ GTP	220
$\bar{U}_{1h}$	+ RNase	0

Inkubation: 90 Min. bei 37°C

RNase: 2x

Inkubationsvolumen: 1 ml

d,l-Leucin-1-C¹⁴: 0,05 µm/
Röhrchen

$\bar{U}_{1h}$: 6 mg (Protein)

ATP: 2,5 µm

GTP: 1,25 µm

Durch 14stündige Zentrifugation bei 105.000 g wird der 1 Std-Überstand in ein nukleoproteidhaltiges Sediment (Nukleoproteid-(NP-)Fraktion) und einen nukleoproteidfreien Überstand ($\bar{U}_{14h}$, s.S.18) getrennt. Wird die durch Resuspension in frischem Puffer und erneute 14stündige Zentrifugation gewaschene Nukleoproteid-Fraktion und der undialysierte 14 Std-Überstand getrennt mit Leucin-1-C¹⁴ inkubiert, so wird dieses fast nicht mehr in das Protein eingebaut (Exp.7). Durch Rekombination der gewaschenen Nukleoproteid-Fraktion mit dem 14 Std-Überstand wird die Einbauleistung wiederhergestellt.

Experiment 7

Fraktionen und Zusätze		Einbau (T.p.m.)
$\bar{U}_{1h}$		240
NP-Fraktion		22
$\bar{U}_{14h}$		5
NP-Fraktion	+ $\bar{U}_{14h}$	227

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

NP-Fraktion: 3,5 mg; einmal
gewaschen

Inkubationsvolumen: 1 ml

d,l-Leucin-1-C¹⁴: 0,05 µm/
Röhrchen

$\bar{U}_{1h}$: 5 mg

$\bar{U}_{14h}$: 1,5 mg

Wird der 14 Std-Überstand 20 Stunden gegen Phosphat-Puffer dialysiert, so bewirkt sein Zusatz zur gewaschenen Nukleoprotein-Fraktion nur eine geringe Steigerung des Einbaus (Exp.8). Bei den durch Dialyse entfernten, für den Einbau erforderlichen Substanzen handelt es sich wahrscheinlich um Nukleosidtriphosphate; denn Zusatz von ATP oder GTP zum System gewaschene Nukleoprotein-Fraktion + dialysierter 14 Std-Überstand läßt den Einbau von radioaktiv markiertem Leucin wieder hochschnellen. Der Einbau wird durch RNase inhibiert.

Experiment 8

Fraktionen und Zusätze			Einbau (T.p.m.)
NP-Fraktion			22
"	+ $\bar{U}_{14h}$ (undialys.)		227
"	+ $\bar{U}_{14h}$ (dialys.)		69
"	"	+ ATP	352
"	"	+ GTP	339
"	"	+ ATP + RNase	19
$\bar{U}_{14h}$ (dialys.)		+ ATP	15

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

ATP: 2,5 μ m

Inkubationsvolumen: 1 ml

GTP: 2,5 μ m

Nukleoprotein-Fraktion: 3,5 mg

RNase: 2 γ

$\bar{U}_{14h}$ (undialys.): 1,5 mg

Leucin-1-C¹⁴: 0,05 μ m/Röhrchen

$\bar{U}_{14h}$ (dialys.): 1,5 mg

Exp.8 zeigt, daß Zusatz von dialysiertem 14 Std-Überstand zum System Nukleoprotein-Fraktion (einmal gewaschen) + ATP (oder GTP) den Einbau beträchtlich steigert. Diese nicht dialysablen Komponenten des 14 Std-Überstandes, die wohl zum Einbau in die Nukleoprotein-Fraktion erforderlich sind, zumindestens jedoch das Einbauvermögen erheblich steigern, lassen sich wie im Falle des Debris-Einbausystems durch isoelektrische Fällung mit verdünnter Essigsäure bei pH = 4 aus dem 14 Std-Überstand präzipitieren. Zusatz dieser pH 4-Fraktion, die zu 90 % aus Protein und zu 10 % aus Ribo-

nukleinsäure besteht, zum System Nukleoproteid-Fraktion + ATP erhöht nämlich den Einbau beträchtlich (Exp.9).

Daß der Einbau in die einmal gewaschene Nukleoproteid-Fraktion schon durch Zusatz von ATP oder GTP allein stark ansteigt, ist wahrscheinlich trotz des einmaligen Waschens auf unvollständige Befreiung der gallertigen Nukleoproteid-Fraktion vom Überstand zurückzuführen. Dafür spricht auch, daß nach mehrmaligem Waschen der Nukleoproteid-Fraktion Zusatz von ATP oder GTP nur noch einen geringen einbausteigernden Effekt hat.

Experiment 9

Fraktionen und Zusätze				Einbau (T.p.m.)
NP-Fraktion				22
"	+ ATP			142
"	+ ATP	+ pH 4-Fraktion		315
"	+ ATP	+ pH 4-Fraktion + RNase		0
"		+ pH 4-Fraktion		47
pH 4-Fraktion + ATP				0

Inkubation: 1 Std. bei 37°C	ATP: 2,5 µm
Inkubationsvolumen: 1 ml	RNase: 2 γ
NP-Fraktion: 3,5 mg	d,1-Leucin-1-C ¹⁴ : 0,05 µm/ Röhrchen
pH 4-Fraktion: 0,6 mg	

Es kann noch nicht gesagt werden, ob das komplette Nukleoproteid-Einbausystem neben der Nukleoproteid-Fraktion und ATP (oder GTP) beider Komponenten der pH 4-Fraktion (Protein + RNS) bedarf. Im Gegensatz zum kompletten Debris-Einbausystem (Debris-Fraktion + RNS + ATP oder GTP) scheint der Proteinanteil der pH 4-Fraktion im Falle des Nukleoproteid-Einbausystems notwendig zu sein. Der Proteinanteil enthält nämlich leucinaktivierendes Enzym, welches in der gewaschenen Nukleoproteid-Fraktion nur in Spuren vorhanden ist, was wohl auf Verunreinigung durch Überstand zurückgeführt werden kann (55).

Ein Hinweis, daß die relativ niedermolekulare Ribonukleinsäure des 14 Std-Überstandes bzw. der pH 4-Fraktion für das komplette Einbausystem erforderlich ist, ergibt sich aus der durch ihren Zusatz zum Nukleoprotein-Einbausystem erzielbaren starken Einbaustimulierung (Exp. 10).

Experiment 10

Fraktionen und Zusätze				Einbau (T.p.m.)
$\bar{U}_{1h}$	+ ATP			50
$\bar{U}_{1h}$	+ ATP	+ RNS		164
$\bar{U}_{1h}$	+ ATP	+ RNS	+ RNase	7

Inkubation: 1 Std. bei 37°C

Inkubationsvolumen: 1 ml

$\bar{U}_{1h}$: 2,5 mg

RNase: 2 μ

RNS: 0,2 mg; nach der Phenol-

Methode aus dem 14 Std-

Überstand gewonnen

d,l-Leucin-1-C¹⁴: 0,05 μ m/
Röhrchen

Die Abhängigkeit des Einbaus von der ATP-Konzentration ist in Abbildung 11 dargestellt. Der maximale Einbau ist bei etwa 2,5 μ m ATP pro ml erreicht, in höheren Konzentrationen wird er gehemmt. Für GTP gilt ähnliches.

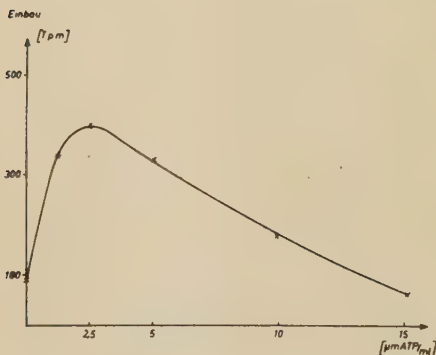


Abb. 11: Abhängigkeit des Einbaus von Leucin-1-C¹⁴ ins Nukleoprotein-System von der ATP-Konzentration.

Inkubation: 1 Std. bei 37°C
in 1 ml-Ansätze

$\bar{U}_{1h}$: 5 mg

Leucin-1-C¹⁴: 0,1 μ m

Der zeitliche Verlauf des Einbaus wird in Abbildung 12 gezeigt. Man erkennt, daß der Sättigungswert nach Zusatz von Nukleosidtriphosphat später erreicht wird (nach etwa 90 Minuten) und absolut höher liegt als in dessen Abwesenheit. Zusatz von Triphosphat nach erreichter Sättigung bringt den Einbau wieder in Gang. Unter den gewählten Versuchsbedingungen ist demnach die Verfügbarkeit von Triphosphat für das Einbauvermögen maßgebend.

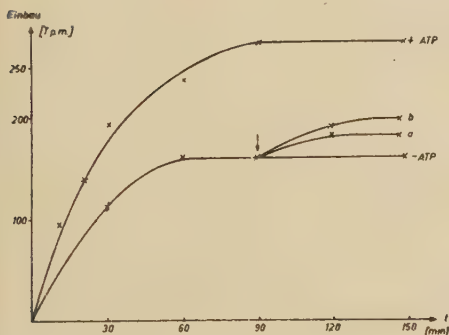


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des Einbaus von Leucin-l-C¹⁴ in einen undialysierten 1 Std-Überstand.

Inkubation: bei 37°C in
Leucin-l-C¹⁴: 0,1 µm
+ ATP: Zusatz von 2,5 µm
ATP bei Inkubationsbeginn

- ATP: kein ATP-Zusatz während der Inkubation von 0-90 Min.

Pfeil: Zusatz von 2,5 µm ATP (a) bzw. von 2,5 µm ATP + 1,25 µm GTP (b).

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, ist das System durch etwa 0,3 µm d,l-Leucin-l-C¹⁴ abgesättigt.

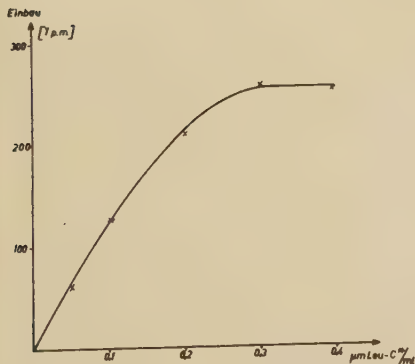


Abb. 13: Abhängigkeit des Einbaus in den 1 Std-Überstand von der Leucin-l-C¹⁴-Konzentration.

Inkubation: 1 Std. bei 37°C in
1 ml-Ansätzen

U_{1h}: 5 mg

Der Einbau von d,l-Leucin-l-C¹⁴ läßt sich durch Zusatz eines großen Überschusses nicht markierten l-Leucins (4 μ m/ml) z.B. nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten abstoppen (Exp.11). Daraus ergibt sich, daß nur l-Leucin eingebaut wird.

Das eingebaute markierte Leucin wird bei weiterer Inkubation fast nicht gegen nicht markiertes ausgetauscht (Exp. 11). Der Einbau ist demnach irreversibel.

Experiment 11

Fraktionen	Inkubationszeit	Einbau (T.p.m.)
Ü _{1h} (undialys.)	30 Min.	94
Ü _{1h} "	90 "	162
Ü _{1h} "	90 " (nach 30 Min. Zusatz von 4 μ m l-Leucin- C ¹² , dann weitere Inkuba- tion von 60 Min.)	85

Inkubationsvolumen: 1 ml

Ü_{1h} (undialys.): 4,8 mg

d,l-Leucin-l-C¹⁴: 0,05 μ m/Röhrchen

Diskussion

Der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren ins Protein von aus Bakterien isolierten in vitro-Systemen wurde bisher entweder an Bakterien-Protoplasten (Spiegelmann, Mc Quillen u.a.) oder sog. "broken cell preparations" (Gale und Folkes, Nissmann u.a.) studiert. Diese Präparationen können als noch weitgehend funktionstüchtige Zellen mit teilweise zerstörter oder entfernter Zellwand angesehen werden. Ihr komplexer Charakter machte die Analyse der Gesamtheit der an der Proteinbiosynthese beteiligten Einzelschritte nahezu unmöglich. Es konnte bisher nicht gesagt werden, ob die Proteinbiosynthese in Bakterien nach ähnlichen Reaktionsmechanismen verläuft, wie sie mit Hilfe der "löslichen" Mikrosomensysteme aus Säugerzellszellen aufgeklärt wurden. In Bakterien wurde bisher kein "lösliches" Einbausystem nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Isolierung zweier fraktionierbarer Enzymsysteme aus Homogenaten E.coli B-Bakterien berichtet, die radioaktiv markierte Aminosäure ins Protein einzubauen vermögen.

Das "lösliche" sog. Nukleoproteid (NP)-System läßt sich in definierte Teilkomponenten im Sinne der makromolekularen Chemie zerlegen:

- a) Nukleoproteid-Partikel mit einem Teilchengewicht von ca. 1-2 Millionen. Sie bestehen zu etwa gleichen Teilen aus Protein und Ribonukleinsäure.
- b) Aminosäureaktivierende Enzyme und "lösliche" Ribonukleinsäure (sRNS), welche im 14 Std-Überstand enthalten sind.
- c) Nukleosidtriphosphat (ATP oder GTP).

Das grobpartikuläre sog. Debris-System besteht aus:

- a) der wohl aus membranösem Material zusammengesetzten Debris-Fraktion,
- b) einer relativ niedermolekularen Ribonukleinsäure (sRNS),
- c) Nukleosidtriphosphat (ATP oder GTP).

Daß es sich um Einbau markierter Aminosäure ins Protein der beiden charakterisierten Systeme und nicht etwa in als Verunreinigung vorhandene unzerstörte Bakterien handelt, wird durch folgende Argumente bewiesen:

Alle Fraktionen außer der Debris-Fraktion wurden vor Verwendung hochtourig zentrifugiert (20 Minuten, 20.000 g), um etwa vorhandene Bakterien abzuschleudern. Zur Bakterienkontrolle wurden immer Zählteste ausgeführt, indem mit den einzelnen Fraktionen bestrichener fester Nähragar nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C auf Bakterienkolonien kontrolliert wurde. Es zeigte sich, daß der 1 Std-Überstand, der 14 Std-Überstand und die Nukleoproteid-Fraktion immer vollkommen frei von Bakterien waren. Die Debris-Fraktion enthielt manchmal eine geringe Zahl von Bakterien, die allerdings für die beim Debris-System beschriebenen Ergebnisse keine Rolle spielen. Der Einbau war in beiden Systemen schon durch geringste Mengen von Ribonuklease zu unterbinden. Inkubiert man dagegen geringe Mengen von Bakterien mit z.B. 1 Std-Überstand und radioaktiv markiertem Leucin, so findet ein nicht ribonukleasesensitiver logarithmischer Einbau statt. Auch nach längerer Präinkubation der Fraktionen vor Zusatz der markierten Aminosäure war der Einbau nicht erhöht, meist sogar deutlich herabgesetzt. Wenn sich eventuell noch vorhandene Bakterien während der Präinkubationsperiode vermehrt hätten, wäre eine kräftige Steigerung des Einbaus zu erwarten gewesen. Als letztes Argument sei noch der zeitliche Verlauf des Einbaus in beiden Systemen erwähnt, der ja nach 60-90 Minuten ein Plateau erreicht und dieses bei weiterer Inkubation hält, was bei Anwesenheit von Bakterien unmöglich wäre.

Durch folgende Argumente wird belegt, daß die ins Protein eingebaute markierte Aminosäure (Leucin-1-C¹⁴) peptidartig im Inneren der Kette gebunden ist (54): Durch heiße Trichloressigsäure kann sie nicht ausgewaschen werden. Perameisensäurebehandlung entfernte nur einen geringen Teil (ca. 20 %) der ins Protein eingebauten Aminosäure. Nach anschließender Umsetzung mit Fluordinitrobenzol und folgender Totalhydrolyse mit 6n-HCl zeigte sich bei der Isolierung des Dinitrophenyl-Leucins und des freien Leucins aus dem Hydrolysat, daß ein großer Teil des

markierten Leucins nicht entstndig, sondern innerhalb der Peptidkette gebunden vorlag.

Ob der in beiden zellfreien Systemen beobachtete Einbau markierter Aminosäure Ausdruck des Ablaufs einer Proteinnetto-synthese ist, bleibt wie bei allen bekannten Systemen dieser Art zu klären. Die Nichtumkehrbarkeit des Prozesses spricht dafür. Die absolute Einbauleistung (0,04 % Austausch im Debris-System, 0,01 % im NP-System) lässt sich durch Verwendung eines geeigneten ATP-regenerierenden Systems noch wesentlich steigern.

Unterscheidende und gemeinsame Merkmale der beiden Einbausysteme:

Während im Debris-System sämtliche 20 aminosureaktivierenden Enzyme vorhanden sind, und zwar strukturgebunden in der Debris-Fraktion, ließen sich im NP-System nur die bereits von Novelli und De Moss beschriebenen 10 aktivierenden Enzyme in löslicher Form (im 14 Std-Überstand) nachweisen (55). Wenn die Aktivierung sämtlicher Aminosäuren Voraussetzung für die Verwendung in der Proteinbiosynthese wäre, könnte eine Neusynthese von Protein im NP-System nur nach Zusatz der fehlenden Enzyme erreicht werden.

Für beide Systeme ist dieselbe lösliche Ribonukleinsäure (sRNS) erforderlich. Sie enthält erhebliche Mengen sämtlicher Aminosäuren in carboxyl-aktivierter Bindung (55). Das Vorhandensein dieses "inneren Aminosurepools" erklärt das Versagen von Versuchen, den Einbau einer markierten Aminosäure durch Zusatz der übrigen nichtmarkierten zu steigern. Der Nachweis des "20-Aminosäure-Effekts" wäre ein starkes Argument für das Stattfinden einer de-novo-Proteinsynthese. Es muß versucht werden, unter Verwendung einer desaminoacylierten löslichen RNS-Fraktion den 20-Aminosäure-Effekt nachzuweisen.

Die lösliche RNS erfüllt eine Transportfunktion für die aktivierte Aminosäure zum Syntheseort hin. Dies konnte folgendermaßen gezeigt werden (55): Eine nach der Phenolmethode aus dem 14 Std-Überstand isolierte Nukleinsäure, die radioaktiv markiertes Leucin enthält, überträgt dieses bei Inkubation mit Debris-Fraktion weiter in deren Protein.

Im NP-System wird die markierte Aminosäure ins Protein der RNP-Partikel eingebaut. Ob auch im Debris-System solche RNP-Partikel die Akzeptorfunktion für den Einbau von Aminosäuren erfüllen, ist noch nicht entschieden.

Alle Versuche, in beiden Systemen ein absolutes Erfordernis für ATP und GTP nachzuweisen, sind fehlgeschlagen. Für die Aktivierung ist ATP notwendig. GTP muß daher in der Lage sein, aus dem System nicht vollständig entferntes oder eventuell gebundenes ATP zu regenerieren. Das Gleiche könnte umgekehrt für GTP gelten.

Durch geringe Mengen von Ribonuklease wurde der Einbau in beide Systeme vollständig inhibiert. Der RNase-Effekt kann an zwei Stellen angreifen: an der am Aminoacyltransport beteiligten löslichen RNS und an der "Nukleinsäure-Matrize" in den Nukleoproteid-Partikeln.

Im Vergleich zu den aus Säugetiergeweben isolierten in vitro-Einbausystemen zeichnen sich die beiden aus E. coli B-Bakterien gewonnenen zellfreien Systeme durch große Stabilität aus. Sie lassen sich in saccharosefreiem Puffer isolieren, wochenlang bei -3°C einfrieren und mehrmals waschen, ohne nennenswert an Einbaufähigkeit zu verlieren. Auch nach 1stündiger Präinkubation bei 37°C verlieren sie nur 20-30 % der Aktivität.

Es wird erhofft, daß die beiden Systeme zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der Proteinbiosynthese beitragen werden. Das komplexe Debris-System, das alle zum Ablauf des Einbauprozesses notwendigen Enzyme strukturgebunden enthält, kann besonders für Versuche zum Nachweis einer Nettosynthese von phagenspezifischem Protein verwendet werden. Das in seine makromolekularen Komponenten zerlegbare Nukleoproteidsystem dürfte insbesondere zum Studium der Beziehungen zwischen "Nukleinsäure-Matrize" und in vitro-Proteinsynthese geeignet sein.

Zusammenfassung

Durch hochtourige Vibration mit Glasperlen aus *Escherichia coli* B-Suspensionen in magnesiumhaltigem, saccharosefreiem Phosphatpuffer erhaltene Homogenate wurden durch differentielle Ultrazentrifugation in Fraktionen zerlegt.

Auf diese Weise wurden zwei Systeme isoliert, die die kovalente Bindung radioaktiv markierten Leucins in das Protein nukleoproteidhaltiger Strukturelemente katalysieren.

Das Debris-System setzt sich aus der grobpartikulären, wahrscheinlich aus Membranbruchstücken bestehenden Debris-Fraktion, einer niedermolekularen RNS-Fraktion und Nukleosidtriphosphat (ATP oder GTP) als Cofaktor zusammen.

Das Nukleoproteid-System besteht aus der bei 105.000 g in 14 Std. sedimentierbaren Nukleoproteid-Fraktion, dem dialysierten Überstand dieser Zentrifugation bzw. der pH 4-Fraktion und ATP oder GTP als Cofaktoren.

RNase hemmt den Einbau vollständig.

Der zeitliche Verlauf und die pH-Abhängigkeit des Einbaus und der quantitative Zusammenhang zwischen Nukleosidtriphosphatkonzentration, Aminosäurekonzentration und Einbau wurden untersucht. Die Bestandteile der einzelnen Fraktionen, insbesondere die makromolekularen Komponenten des NP-Systems, wurden physikalisch und chemisch charakterisiert.

Literatur-Verzeichnis

1. A.D. Hershey, M. Chase; J. Gen. Physiol. 36, 39 (1952).
2. H. Borsook und J.W. Dubnoff; J. Biol. Chem. 132, 307 (1940).
3. F. Lipmann; Advance. Enzymol. 1, 99 (1941).
4. H. Chantrenne; Biochim. Biophys. Acta 2, 286 (1948)
A.L. Dounce; Enzymologia 15, 251 (1952).
5. M.B. Hoagland; Biochim. Biophys. Acta 16, 288 (1955).
6. J.A. De Moss und G.D. Novelli; Proc. Nat. Acad. Sci. 42,
325 (1956).
7. P. Berg; J. Biol. Chem. 22, 1025 (1956).
8. E.W. Davie, V.V. Koningsberger und F. Lipmann; Arch. Bio-
chem. Biophys. 65, 21 (1956).
9. R.D. Cole, J. Coote und T.S. Work; Nature 179, 199 (1957).
10. P. Berg; J. Biol. Chem. 222, 1025 (1956).
11. V.V. Koningsberger, A.M. van de Ven und J.T.G. Overbeek;
Roy. Dutch Acad. Sci. B 60, 141 (1957).
12. R.S. Schweet, R.W. Holley und E.H. Allen; Arch. Biochem.
Biophys. 71, 311 (1957).
13. R.W. Holley; Fed. Proc. 17, 964 (1958).
14. M.B. Hoagland, P.C. Zamecnik und M.L. Stephenson; Biochim.
Biophys. Acta 24, 215 (1957).
15. M.B. Hoagland, M.L. Stephenson, J.F. Scott, L.J. Hecht und
P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem. 231, 241 (1958).
16. R.W. Holley; J. Amer. Chem. Soc. 79, 658 (1957).
17. K. Ogata, H. Nohara und T. Morita; Biochim. Biophys. Acta
26, 656 (1957).
18. S.B. Weiss, G. Acs und F. Lipmann; Proc. Nat. Acad. Sci.
44, 189 (1958).
19. P. Berg und E.J. Ofengand; Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 78
(1958).
20. R.S. Schweet, F.C. Bovard, E. Allen und E. Glassman; Proc.
Nat. Acad. Sci. 44, 173 (1958).
21. G.C. Webster; J. Biol. Chem. 229, 535 (1957).
22. A. Gierer und G. Schramm; Nature 177, 702 (1956); Z.Naturf.
11b, 138 (1956).
23. F.H. Fraenkel-Conrat, B. Singer und R.C. Williams; Biochim.
Biophys. Acta 25, 87 (1957).

24. M. Kramer und F.B. Straub; Biochim. Biophys. Acta 21, 401 (1956).
25. G.D. Hunter und J.A.V. Butler; Biochim. Biophys. Acta 20, 405 (1956).
26. P.C. Zamecnik und E.B. Keller; J. Biol. Chem. 209, 337 (1954).
27. J.W. Littlefield, E.B. Keller, J. Gross und P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem. 217, 111 (1955).
28. E.B. Keller und P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem. 221, 45 (1956).
29. J.W. Littlefield und E.B. Keller; J. Biol. Chem. 224, 13 (1957).
30. G.C. Webster; J. Biol. Chem. 229, 535 (1957).
31. V.G. Allfrey; A.E. Mirsky und S. Osawa; J. gen. Physiol. 40, 451 (1957).
32. E.F. Gale und J.P. Folkes; Bioch. J. 59, 661, 675 (1955).
33. M.V. Simpson, H.M. Bates und V.M. Craddock; Fed. Proc. 17, 1232 (1958).
34. S. Spiegelmann; The Chemical Basis of Heredity, Ed. Mc Elroy und Glass, John Hopkins Press, Baltimors (1957).
35. E.F. Gale und J.P. Folkes; Nature, 175, 592 (1955).
36. B. Nissmann, M.L. Hirsch und J. Marmur, D. Cousin; C.R. Acad. Sci. 241, 1349 (1955).
37. B. Nissmann, M.L. Hirsch und J. Marmur; C.R. Acad. Sci. 240, 1939 (1955).
38. M. Beljansky; Biochim. Biophys. Acta 15, 425 (1954).
39. R.L. Lester; J. Amer. Chem. Soc. 75, 5448 (1953).
40. K. Mc Quillen; Biochim. Biophys. Acta 17, 382 (1955).
41. K. Mc. Quillen; Symp. Soc. gen. Microbiol. 6, 127 (1956).
42. M.R.J. Salton und K. Mc Quillen; Biochim. Biophys. Acta 17, 465 (1955).
43. C. Weilbull; J. Bact. 66, 688 (1953).
44. J.A. De Moss und G.D. Novelli; Biochim. Biophys. Acta 18, 592 (1955).
45. P. Berg; J. Amer. Chem. Soc. 77, 3163 (1955).
46. H. Mickle; J. Roy. Microscop. Soc. 68, 10 (1948).
47. W. Zillig und H. Hölzel; im Druck
48. H. Schuster, G. Schramm und W. Zillig; Z.Naturf. 11b, 339 (1956).

49. P. Stevekitz; J. Biol.-Chem. 195, 449 (1952).
50. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall;
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
51. Z. Dische; Mikrochemie 8, 4 (1930).
52. P. Doty, B. Mc Gill, A. Rice; Proc. Nat. Acad. Sci. 44,
432 (1958).
53. H.K. Schachmann, A.B. Pardee und R.V. Stanier; Arch. Bio-
chim. and Biophys. 38, 245 (1952).
54. W. Zillig, W. Krone, M. Albers, unveröffentlicht.
55. J.L. Mc Corquodale, W. Zillig; im Druck.

Lebenslauf

Am 24. Oktober 1932 wurde ich als Sohn des Hochschulprofessors Paul Schachtschabel und seiner Ehefrau Anna, geb. Möhring in Jena geboren.

Von 1939 bis 1942 besuchte ich in Jena die Grundschule - ein Jahr wurde mir erlassen - und anschliessend bis 1945 das humanistische Gymnasium.

1945 verzogen meine Eltern, mein Bruder und ich von Jena nach Heidenheim in Württemberg und 1948 von dort nach Göttingen. In Heidenheim und Göttingen besuchte ich die Oberschule. Im März 1951 legte ich an der Felix-Klein-Oberschule in Göttingen die Reifeprüfung ab.

Mit dem Sommersemester 1951 begann ich mein Medizinstudium an der Universität in Göttingen, an der ich die ersten sechs Semester studierte. Das medizinische Physikum bestand ich nach dem 5. Semester.

Nach meinem ersten klinischen Semester in Göttingen setzte ich mein Studium vom Sommersemester 1954 bis zum Sommersemester 1955 an der Universität in Freiburg fort. Die beiden letzten klinischen Semester studierte ich in München und bestand dort nach einer Studienzeit von elf Semestern im Dezember 1956 mein medizinisches Staatsexamen.

Vom Februar 1957 bis zum Juli 1958 war ich mit der Anfertigung meiner Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in München beschäftigt.

